



SABEH FRIGI, HAJER ENNAFAA, MOHAMED BEN AMOR, LOTFI CHERNI, AMEL BEN AMMAR-EL GAAIED

POLYMORPHISME DES INSERTIONS ALU CHEZ LES BERBÈRES DE TAKROUNA (TUNISIE): UNE APPROCHE GÉNÉTIQUE À L'ÉTUDE DU PEUPEMENT DE L'AFRIQUE DU NORD

RÉSUMÉ: Dans le cadre d'une étude visant la caractérisation génétique d'un isolat berbère: Takrouna, sept loci Alu polymorphes (ACE, APO-A1, F13B, TPA-25, PV92, B65 et D1) ont été analysés dans un échantillon de 33 Berbères. Les résultats montrent que la variabilité génétique, mesurée à travers l'hétérozygotie, est relativement élevée au niveau de cet isolat. Elle varie de 0.1896 pour ACE à 0.4981 pour TPA-25. Tous les loci sont polymorphes. Ainsi, malgré la petite taille de cette communauté berbère, son ancienneté et l'endogamie pratiquée, on s'attend à un effet de dérive qui va réduire voire annuler la diversité. Or, ce n'est pas le cas. Par ailleurs, pour mieux cerner la structure génétique de cette population, une analyse d'échelonnement multidimensionnel (MDS) ainsi qu'une AMOVA ont été effectués avec d'autres populations du monde. Les résultats montrent que malgré l'isolement de Takrouna, elle a conservé une structure nord-africaine.

MOTS-CLEFS: Alu – Polymorphisme génétique – Takrouna – Berbères – Afrique du Nord

ABSTRACT: To shed light on the study of the genetic structure of an isolated Berber community – Takrouna, seven polymorphic Alu insertions (ACE, APO-A1, F13B, TPA-25, PV92, B65 and D1) have been studied in a sample of 33 Berbers. The results show that genetic diversity, measured by heterozygosity, is relatively high in this community. It varied from 0.1896 concerning ACE to 0.4981 for TPA-25. All loci are polymorphic. Thus, despite its small size, its antiquity and the endogamy realised, one would await a derived effect which reduces, even eliminates this diversity. However, it is not the case. Moreover, to better understand the genetic structure of this population, a multidimensional scaling analysis (MDS) and an AMOVA have been effected with other populations from the world. Results present that in spite of the isolation of Takrouna, this later conserved a North-African structure.

KEY WORDS: Alu – Genetic polymorphism – Takrouna – Berbers – North Africa

INTRODUCTION

Les insertions Alu sont des éléments répétés d'environ 300pb qui forment une composante majeure du génome des primates, puisque leur nombre peut atteindre plusieurs centaines de copies par génome (Weiner *et al.* 1986, Okada 1994). Aucune fonction évidente n'est encore aujourd'hui attribuée à ces insertions mais elles semblent avoir pour origine des éléments mobiles de l'ADN dérivés

principalement des ARN de transfert ou de l'ARN cytoplasmique 7SL (Ullu *et al.* 1982)

Récemment ces insertions Alu ont été investiguées en systématique moléculaire (Huchon *et al.* 2002): en effet l'insertion d'un élément Alu à un site donné est un évènement unique et non réversible à l'échelle des génomes. L'état primitif Alu correspond donc à l'absence de l'insertion, tandis que l'insertion de l'élément Alu dans un locus déterminé représente le changement mutationnel.

Cette connaissance de l'état ancestral et de la direction du changement mutationnel facilite l'analyse des relations phylogénétiques entre espèces et populations (Santovito *et al.* 2004) et a permis d'améliorer la taxonomie des primates ainsi que la phylogéographie des populations humaines (Huchon *et al.* 2002, Batzer *et al.* 1994, De Pancorbo *et al.* 2001).

Nous avons analysé sept loci (D1, APO A1, FXIII B, TPA-25, ACE, PV92 et B65) qui sont le siège d'insertions Alu, dans le but d'étudier la structure génétique de l'isolat Berbère de Takrouna situé au sommet du Jbel Takrouna (à 200 m d'altitude), au Nord de la Tunisie. Ce petit village de 500 habitants est un monument naturel qui se détache des plissements de la dorsale tunisienne. C'est un site historique qui constitue le reliquat d'un des plus importants foyers de la présence berbère dans la région (Ghalia 1994).

L'origine des populations Berbères n'est pas encore clairement établie, mais on considère leurs ancêtres comme les plus anciens habitants du Nord de l'Afrique. Les Berbères ont connu un passé marqué par de nombreuses invasions et conquêtes qui ont induit de profonds changements sur les autochtones nord-africains, pouvant correspondre soit à des métissages ou à un isolement accompagné de dérive. L'étude des populations Berbères actuelles permet d'apporter des éléments de réponse sur la question du peuplement du Nord de l'Afrique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Populations étudiée

La population qui a fait l'objet de cette étude est formée de 33 sujets berbères issus de familles non apparentées, originaires de Takrouna depuis au moins 4 générations.

Extraction et amplification des échantillons

Pour chaque sujet, 5 ml de sang périphérique ont été prélevés sur héparine. L'ADN génomique a été extrait selon

la méthode de phénol-chloroforme. Chaque échantillon d'ADN a été ensuite amplifié par PCR (Batzer *et al.* 1994, Hammer 1994) en utilisant des amorces spécifiques (*Tableau 1*). La réaction de PCR a été effectuée dans un volume de 25 µl, contenant 30 nano gramme d'ADN, conformément aux conditions indiquées dans la littérature pour les différents loci (Acrot *et al.* 1995, Chbel *et al.* 2003). Les produits d'amplification ont été ensuite analysés et visualisés sur gel d'agarose à 2%.

Analyse statistique

Pour chaque marqueur, les fréquences alléliques ont été calculées par comptage direct. L'évaluation de l'équilibre de Hardy-Weinberg et le calcul de l'hétérozygotie ont été réalisés à l'aide du programme GENEPOP3.3 (Guo *et al.* 1992).

Sur la base des fréquences alléliques, des distances génétiques (Fst) ont été établies entre paires de populations (Takrouna ainsi que d'autres populations Nord-africaines, sub-Saharienne et Européennes) et ont été utilisées pour réaliser une Analyse d'échelonnement multidimensionnel (MDS) à l'aide du programme SYSTAT (SPSS 11).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous avons tout d'abord déterminé les fréquences d'insertions Alu chez la population de Takrouna (*Figure 1*): on observe que les sept loci analysés sont polymorphes dans ce village. Les valeurs d'insertion les plus basses sont observées pour les loci ACE, PV92 et FXIII B. Ces résultats montrent que malgré la petite taille de la population, son ancienneté et l'endogamie pratiquée, on remarque qu'il n'y a pas d'allèle fixé. Tous les loci sont polymorphes. Pour mieux comprendre cette situation, nous avons procédé à une comparaison entre Takrouna et une population cosmopolite tunisienne (Comas *et al.* 2000) de taille importante. Dans le *Tableau 2* sont représentées les données relatives aux

TABLEAU 1. Alu, localisation chromosomique, séquences et températures d'utilisation des amorces

Alu insertion	Localisation chromosomique	5'primer séquence (5' -3')	3'primer séquence (5' -3')	Ta (°C)
TPA 25	8	GTAAGAGTTCGGTAACAGGACAGCT	CCCCACCCTAGGGAGAAGCTTCTCTTT	58
ACE	17	CTGGAGACCACTCCCATCCTTCT	GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT	58
APO	11	AAGTGCTGTAGGCCATTTA GATTAG	AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA	50
FXIII B	1	TCAACTCCATGAGATTTTCAGAAGT	CTGGAAAAAATGTATTCAGGTGAGT	56
B65	22	ATATCCTAAAAGGGACACCA	AAAATTTATGGCATGCGTAT	52
D1	3	AAAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG	AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA	50
PV92	16	GTAAGAGTTCGGTAACAGGACAGCT	CCCCACCCTAGGAGAAGCTTCTCTTT	58

TABLEAU 2. Fréquences d'insertion Alu dans Takrouna et dans une population tunisienne cosmopolite.

Populations	n	B65	ACE	D1	APO	FXIII B	PV92	TPA-25
Takrouna	33	0.560	0.106	0.348	0.863	0.212	0.121	0.469
Tunisiens cosmopolites	48	0.593	0.239	0.239	0.875	0.343	0.312	0.604

TABLEAU 3. Équilibre de Hardy-Weinberg – Diversité Génétique (hétérozygotie). HW: valeurs de p du test de l'équilibre de Hardy-Weinberg; Het: Hétérozygotie; Het moy: Hétérozygotie moyenne; *: déviation à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

		B65	ACE	D1	APO-A1	FXIII B	PV92	TPA-25	Het moy
Takrouna	HW	0.2497	0.4955	0.0001*	0.0404*	0.1145	0.3999	0.6150	0.3411
	Het	0.4926	0.1896	0.4244	0.2355	0.3342	0.2130	0.4981	
Tunisiens cosmopolite	HW	0.0055*	0.7090	0.1053	1.0000	0.3592	0.7474	0.3671	0.4030
	Het	0.4827	0.3645	0.3959	0.2188	0.4514	0.4298	0.4785	

fréquences d'insertion Alu chez les deux populations. Les valeurs de p du test de l'équilibre de Hardy-Weinberg, les valeurs d'hétérozygotie pour chaque locus et l'hétérozygotie moyenne pour la population de Takrouna et celle cosmopolite tunisienne sont indiquées dans le *Tableau 3*.

A partir des résultats du *Tableau 2*, on remarque que pour 4 des 7 loci (B65, ACE, D1, APO-A1, TPA-25, PV92 et FXIII B), Takrouna présente des fréquences différentes de celles de la population cosmopolite: Il s'agit des loci ACE, FXIII B, PV92 et TPA25. Le *Tableau 3* montre que les fréquences alléliques sont conformes à l'équilibre Hardy-Weinberg, à l'exception du locus D1 et APO-A1 pour Takrouna et B65 pour la population cosmopolite. Ces déviations représentent probablement des fluctuations statistiques occasionnelles. Il est intéressant de signaler que

la diversité génétique, calculée à travers l'hétérozygotie, atteint des valeurs importantes pour les loci TPA-25 et B65 au niveau des deux populations, mais les valeurs sont plus élevées au niveau de Takrouna. Globalement la diversité génétique est plus importante au niveau de la population tunisienne cosmopolite qu'au niveau de Takrouna.

A partir de cette comparaison on constate qu'il y a des différences dans les fréquences alléliques entre les deux populations et comme attendu une structure génotypique différente. Malgré la petite taille de Takrouna, son ancienneté et l'endogamie, on s'attendrait à un effet de dérive et des taux d'homozygotes élevés. Or, il n'y a pas d'allèles fixés, tous les loci sont polymorphes. Il n'y a pas d'écart à la panmixie sauf pour D1 et on remarque que certains loci ont un taux d'hétérozygotie important.

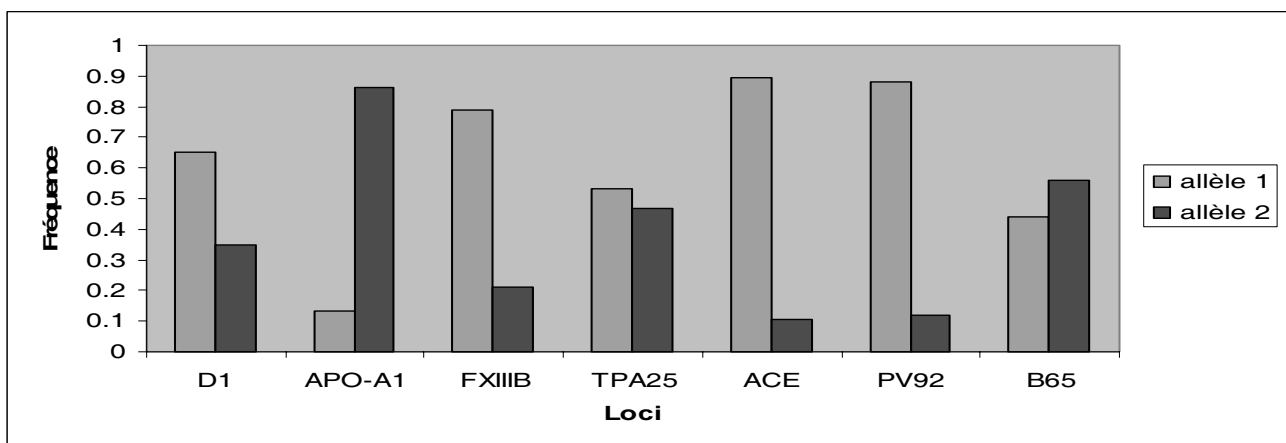


FIGURE 1. Fréquences des allèles Alu dans la population de Takrouna. Allèle 1: absence de l'insertion; Allèle 2: présence de l'insertion.

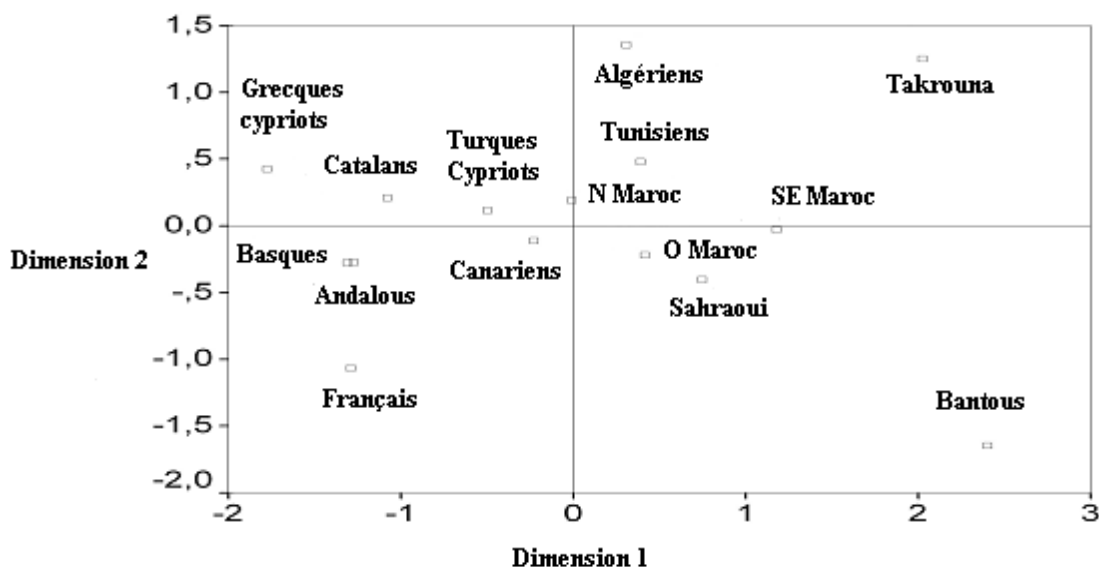


FIGURE 2. Analyse d'échelonnement multidimensionnel (MDS). N Maroc: Nord du Maroc; SE Maroc: Sud Est du Maroc; O Maroc: Ouest du Maroc.

L'analyse locus par locus n'apporte pas d'informations, pour cela on a procédé à une comparaison de l'ensemble des loci dans une MDS (Figure 2) et en incluant plusieurs populations Nord-africaines, Subsaharienne et Européennes (Stoneking *et al.* 1997, Comas *et al.* 2000). L'analyse multidimensionnelle montre que Takrouna occupe une position relativement isolée par rapport aux autres populations nord-africaines: ceci est probablement la conséquence de la dérive génétique et de l'effet fondateur qui opèrent dans les petites populations.

La structure génétique de la population de Takrouna ainsi que d'autres populations nord-africaines est testée par le calcul de la variance moléculaire (Excoffier *et al.* 1992). Cette approche est déterminée sur le programme Arlequin (AMOVA). Dans une première étape nous avons considéré un seul groupe celui de toutes les populations nord-africaines étudiées: Takrouna, Nord du Maroc, Ouest du Maroc, Est du Maroc, Sahara, Algérie, Tunisie cosmopolite (Comas *et al.* 2000). Les résultats montrent une variance

intra-population de 98.96% ; la variance inter population est de 1.04% ($P < 0.001$) (Tableau 4). La même analyse a été effectuée par Comas *et al.* (2000) mais en considérant les populations de l'Ibérie. Les résultats montrent que la variance inter population est de 0.26% ($P = 0.172$) suggérant une homogénéité au niveau de ces populations. On peut conclure ainsi que les populations du Nord de l'Afrique sont plus hétérogènes résultats de leur diversité génétique.

Dans une deuxième étape nous avons considéré le pool formé par les populations nord-africaines (en incluant la population de Takrouna) d'une part et les populations de l'Ibérie d'autre part. Dans ce cas la variance intergroupe est de 2.25% ($p = 0.01$). Cette variance est supérieure à celle intragroupe (entre les populations du même groupe) qui est de 0.79% ($p < 0.001$). Le maximum de variance se situe entre les populations: 96.95%. Ceci met en évidence un effet groupe et indique une distinction dans la structure génétique des populations de l'Afrique du Nord et celle de l'Ibérie. Si on procède à la même analyse mais en éliminant la

TABLEAU 4. Analyse de la variance moléculaire (AMOVA).

Groupes	% de variance intergroupe	% de variance intra-groupe	% de variance intra-population
Populations africaines	-	1.04	98.96
Populations africaines versus populations ibériennes	2.25	0.79	96.95
Populations africaines (sans Takrouna) versus populations ibériennes	2.29	0.46	97.25

population de Takrouna du pool nord-africain, dans ce cas la variance intergroupe est de 2.29% ($p=0.008$). La variance intragroupe est de 0.46% ($p=0.002$). Cette dernière analyse montre que malgré l'isolement de Takrouna, elle possède toujours une structure nord-africaine.

La présente étude a pour but de contribuer à décrire, en utilisant des marqueurs génétiques peu polymorphes, la structure génétique d'une population berbère située au Nord de la Tunisie: Takrouna et d'analyser la complexité de l'histoire du peuplement de l'Afrique du Nord et ceci à travers l'exemple d'une population relativement bien caractérisée. En effet, Takrouna est un site ancien. A la fois berbère et punique, le village accroché à un promontoire rocheux ses maisons de teinte rouge brun. L'endroit conserve de nombreuses traces d'une occupation humaine très lointaine, en particulier des symboles puniques de Tanit (la déesse de la fertilité), ainsi que des vestiges de fours. L'architecture générale présente une certaine singularité: on semble y lire un plan en forme de croix latine. On attribue cette curiosité à la présence de Romains ou de Berbères christianisés qui auraient transmis cette tradition architecturale à leurs descendants. Ceux-ci auraient ainsi «résisté» à leur manière à l'islamisation qui gagna tout le pays à partir du VII^{ème} siècle. Dans le village, on verra néanmoins une mosquée et un mausolée d'un style beaucoup plus ottoman. De la montagne l'eau coule vers les plaines en direction de Zaghuan. Les Romains construisirent un aqueduc qui amenait l'eau jusqu'à Carthage et dont subsistent, aujourd'hui encore quelques vestiges. Les données historiques montrent que le nom Takrouna serait une évolution probable du mot «Takrount» terme berbère qui veut dire corne. L'origine berbère des takrounais ainsi que l'importante altitude de cette «dechera» sont en accord avec cette explication. Les résultats de cette étude sont relativement en accord avec les données historiques qui confèrent aux Takrounais une origine marocaine (Ghalia 1994).

En conclusion, cette population berbère devait être à l'origine diversifiée. La réduction de la taille de la population à 500 habitants, a probablement favorisé l'effet de la dérive génétique qui aurait abouti à un changement de structure génétique donnant à la population un statut d'isolat et aurait réduit la diversité au niveau de Takrouna mais ne l'a pas aboli.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent à tous les donneurs du sang, volontaires, qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Cette étude a été financée par le Ministère de recherche, de technologie et de développement des compétences.

BIBLIOGRAPHIE

- ACROT S., FONTIUS J., DEININGER L., BATZER M. A., 1995: Identification and analysis of a young polymorphic Alu element. *Biochimica et Biophysica Acta* 1263: 99–102.
- BATZER M. A., STONEKING M., ALEGRIA-HARTMAN M., 1994: African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12288–12292.
- CHBEL F., PANCORBO M. M., MARTINEZ-BOUZAS C., AZEDDOUG H., ALVAREZ-ALVAREZ M., RODRIGUEZ-TOJO J., NADIFI S., 2003: Polymorphism of six Alu insertions in Morocco: comparative study between Arabs, Berbers and Casablanca residents. *Russian J. of Genetics* 329: 1184–1190.
- COMAS D., CALAFELL F., BENCHEMSI N., HELAL A., LEFRANC G., STONEKING M., BATZER M. A., BERTRANPETIT J., SAJANTILA A., 2000: Alu insertion polymorphisms in NW Africa and the Iberian Peninsula: evidence for a strong genetic boundary through the Gibraltar Straits. *Human Genetics* 107: 312–319.
- DE PANCORBO M. M., LOPEZ-MARTINEZ M., MARTINEZ-BOUZAS C., 2001: The Basques according to polymorphic Alu insertions. *Human Genetics* 109: 224–233.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P. E., QUATTRO J. M., 1992: Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction Data. *Gene* 131: 479–491.
- GHALIA T., 1994: *Au pays de l'Enfidha*. L'Agence de Mise en Valeur du Patrimoine et de Promotion Culturelle, Tunis. 32 pp.
- GUO S., THOMPSON E., 1992: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361–372.
- HAMMER M. A., 1994: A recent insertion of an Alu element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies. *Molecular Biology and Evolution* 11: 749–761.
- HUCHON D., NIKAIIDO M., OKADA N., 2002: Éléments mobiles SINE en phylogénie. *Médecine/Sciences* 18: 1275–1281.
- OKADA N., 1994: Retroposones as time marker of evolution. *Proteins, Nucleic Acids, and Enzymes* 39: 2724–2735.
- SANTOVITO A., MARIN A., ZAMPICININI G. P., GIROTTI M., BIGATTI M. P., LAMBERTI L., DEL PERO M., SELVAGGI A., CERVELLA P., 2004: Polymorphismes par insertion Alu dans trois populations du Nord de l'Italie. *Antropo* 7: 45–53. www.didac.ehu.es/antropo
- STONEKING M., FONTIUS J. J., CLIFFORD S. L., SOODYALL H., ACROTT S. S., SAHA N., JENKINS T., TAHIR M. A., DEININGER P. L., BATZER M. A., 1997: Alu insertion polymorphisms and human evolution: evidence for a larger population size in Africa. *Genome Research* 7: 1061–1071.
- ULLU E., ESPOSITO V., MELLI M., 1982: Evolutionary conservation of the human 7S RNA sequences. *J. of Molecular Biology* 15: 195–201.
- WEINER A. M., DEININGER P. L., EFSTRATIADIS A., 1986: Non-viral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annual Review of Biochemistry* 55: 631–661.

Sabeh Frigi
Hajer Ennafaa
Mohamed Ben Amor
Lotfi Cherni
Amel Ben Ammar-El Gaaied
Laboratoire de Génétique, Immunologie
et pathologies Humaines
Faculté des Sciences de Tunis
Université El Manar
2092 El Manar II, Tunis, Tunisie
E-mail: sabehfrigi@yahoo.fr